

Etablierung eines 17 Farben Panels zur Detektion von regulatorischen

T-Zellen bei Mäusen

Sascha, Beck, BMA 17-20 B

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

DBMR Departement for BioMedical Research, Zytometriellabor

1. Zusammenfassung

Die regulatorischen T-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr. Sie werden daher oft in der Forschung verwendet. Um die regulatorischen T-Zellen möglichst präzise detektieren zu können, ist es hilfreich so viele Oberflächen- wie auch intrazelluläre Marker bestimmen zu können. Das Ziel der Diplomarbeit ist deshalb, den Nutzern des Zytometriellabors des DBMR ein Protokoll zur Erstellung eines 17 Farben Panels für die Durchflusszytometrie und die Detektion von regulatorischen T-Zellen bei Mäusen zur Verfügung zu stellen. Für die Umsetzung wird die «Guided Panel Solution» (GPS) von BD Biosciences verwendet. Mit der GPS sind als erstes die geeigneten Marker und Fluorochrome ausgewählt worden. Es sollte darauf geachtet werden, dass die auf der Zielzelle stark exprimierten Marker den weniger hellen Fluorochromen zugeteilt werden und umgekehrt. Die GPS bietet eine sehr gute Hilfestellung beim Erstellen des Panels, da es von der Auswahl der Antikörper, bis hin zur passenden Antikörper/Fluorochrom Kombination Hilfe anbietet. In einem nächsten Schritt sind Titrations der Antikörper sowohl mit aufgetauten, wie auch mit frischen Zellsuspensionen aus Mäusemilzen und -thymi durchgeführt worden. Die Resultate dieser Titrations zeigten auf, dass die Population der Zielzellen mit den frischen viel klarer erkennbar sind als mit den aufgetauten Zellsuspensionen. Die Messungen wurden auf dem LSR II durchgeführt und mit der Flowjo Software ausgewertet. Um ein funktionierendes Panel zu erhalten muss das Panel, welches hier erstellt wurde, noch praktisch getestet werden. Sollte das Panel nicht funktionieren, müssten allenfalls die Fluorochrome oder aber auch die Filter im LSR II angepasst werden.

Schlüsselwörter: Regulatorische T-Zellen, Mehrfarben-Paneldesign, Durchflusszytometrie, GPS

2. Einleitung

Regulatorische T-Zellen

Bei den Regulatorischen T-Zellen (Tregs) handelt es sich um eine Subpopulation der Cluster of Differentiation 4+ (CD4+) T-Zellen. Weiter werden sie noch je nach Herkunftsort in naive regulatorische T-Zellen (nTregs) und induzierte regulatorische T-Zellen (iTregs) unterteilt. Die nTregs entstammen dem Thymus, während die iTregs bereits in die Peripherie ausgeschwemmt sind.

Die Tregs machen bei Mäusen rund 1-4% der Zellen aus sekundären lymphatischen Organen aus.

Die Hauptfunktion der Tregs ist die Unterdrückung und Beendigung der Immunantwort. [1]

Guided Panel Solution

Bei der GPS handelt es sich um ein Hilfsmittel von BD Biosciences, mit dem man ein eigenes Panel erstellen kann. Es bietet eine Schritt-für-Schritt Anleitung, bis zur Fertigstellung des Panels. [2]

Fluorochrome	Antikörper	Antikörper-Engineer
CD327	BV600	Violet
CD25	BV711	Violet
FoxP3	PE	Yellow-Green
CD32.5 (Selected)	PE-Cy594	Yellow-Green
AIR	PE-Cy7	Yellow-Green
HLA-DR	AlloPhar 647	Red
CD45	BV563	UltraViolet
CD44	BV777	UltraViolet
CD197 (CCR5)	BV605	Violet
CD137 (GITR)	BV786	Violet
CD4	BV795	UltraViolet
CD45RA	PerCP-Cy5.5	Blue
Isotyped	Verdillu anti-CD3 Fluores-Dye	Blue
CD19	AlloPhar 750	Red
Ly6E and Ly6C	APC-Cy7	Red
CD3	RedX-Blue	Violet
CD8	V500	Violet

Abb. 3: Zuteilung Marker/Fluorochrome

3. Ziele und Fragestellungen

Zielsetzung 1: In dieser Arbeit soll mit Hilfe der GPS von BD Biosciences ein 17 Farben Panel zur Detektion von regulatorischen T-Zellen bei Mäusen erstellt werden. Das Panel soll den Nutzern des Zytometriellabors zur Verfügung gestellt werden können. Des Weiteren soll die Arbeit dazu dienen, den Nutzern die Erstellung eigener Panels mit Hilfe der GPS zu ermöglichen.

Fragestellung 1: Macht es einen Unterschied, ob die Zellsuspension für die Antikörpertitration eingefroren war oder eine frische Zellsuspension verwendet wurde?

Referenzen

[1] <https://www.miltenyibiotec.com/US-en/resources/mac3-handbook/mouse-cells-and-organs/mouse-cell-types/regulatory-t-cells-mouse.html> (2020)

[2] <https://bdbiosciences.azurewebsites.net/PanelDesignTools/Start/520c48b4-0455-421d-8f9b-9b0849d03169> (2020)

Abbildungen

Abb. 3 Beck S. Stand 30.05.2020) Zuteilung Marker/Fluorochrome <https://bdbiosciences.azurewebsites.net/PanelDesignTools/DesignPanel/520c48b4-0455-421d-8f9b-9b0849d03169>

Abb. 5 Beck S. Zusammenstellung der Titration von CD4 mit aufgetauter Zellsuspension (2020), eigene Abbildung, Burgdorf

Abb. 7 Beck S. Zusammenstellung der Titration von CD4 mit frischer Zellsuspension (2020), eigene Abbildung, Burgdorf

Tabellen

Tab. 1: 96 Well Platten für Antikörpertitration (eigene Darstellung)

4. Material, Methodik, Vorgehen

Herstellung der Zellsuspension:

Die in PBS (Phosphat Buffered Saline) aufbewahrten Mäusemilzen und -thymi zwischen zwei Objektträgern verreiben. Die Suspension durch ein Sieb filtern. Danach zentrifugieren. Um die Erythrozyten zu lysieren 180µl MilliQ Wasser dazugeben und nach 10s 20µl 10x PBS dazugeben. Nochmals durch das Sieb filtern und nochmals gleich zentrifugieren. In 1ml Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Buffer resuspendieren. Zellen zählen und sie danach nochmals zentrifugieren. In Fetal Bovine Serum (FBS) resuspendieren (ca. 1x10⁷ Zellen/ml). Korrekte Menge an DMSO (Dimethyl Sulfoxid) dazugeben (10%) und 1,5ml Aliquots herstellen, falls die Zellsuspension eingefroren werden soll. Ansonsten die Zellsuspension schnellstmöglich verwenden.

Antikörpertitration:

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration für die Messungen werden die Antikörper vorgängig titriert. Nach dem Analysieren im LSR II und der Auswertung im Flowjo sieht man die optimale Konzentration bei der Verdünnung mit der höchsten «signal/noise ratio». Die «signal/noise ratio» errechnet sich dadurch, dass man die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der positiven Population durch die MFI der negativen Population der jeweiligen Antikörperkonzentrationen rechnet.

Tab. 1: 96 Well Platten für Antikörpertitration

5. Ergebnisse/ Resultate

Resultat der aufgetauten Zellsuspension:

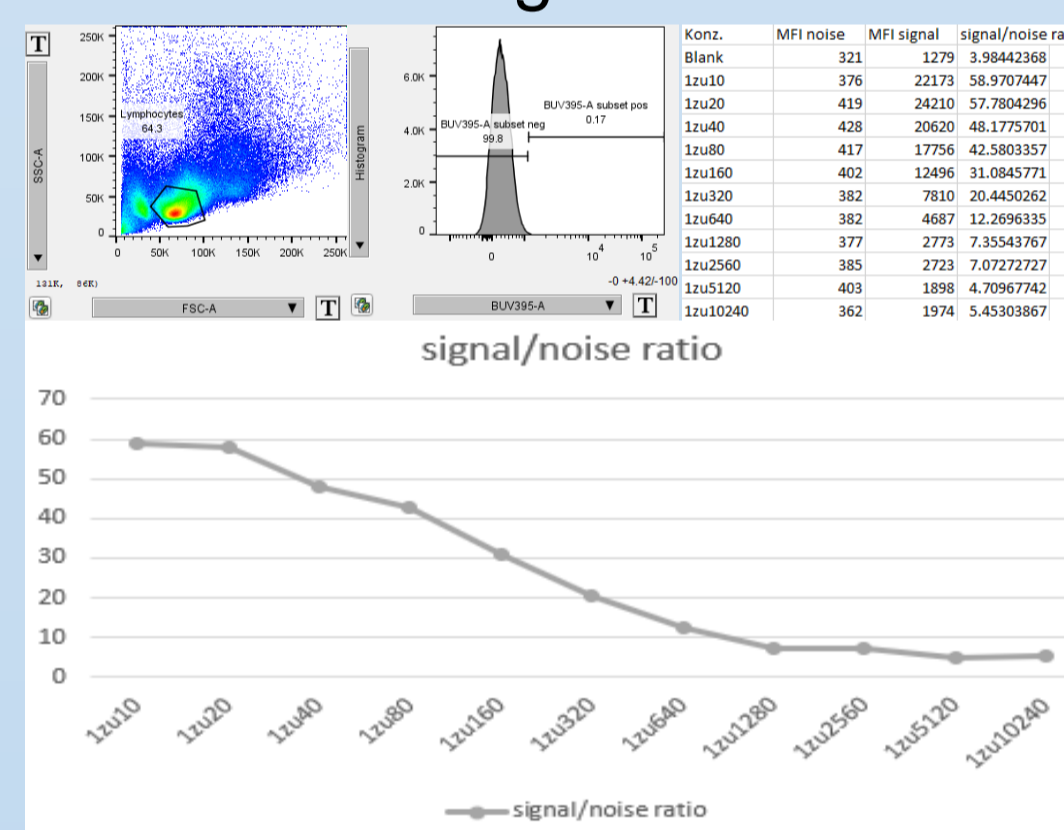


Abb. 5: Zusammenstellung der Titration von CD4 mit aufgetauter Zellsuspension

Resultat der frischen Zellsuspension:

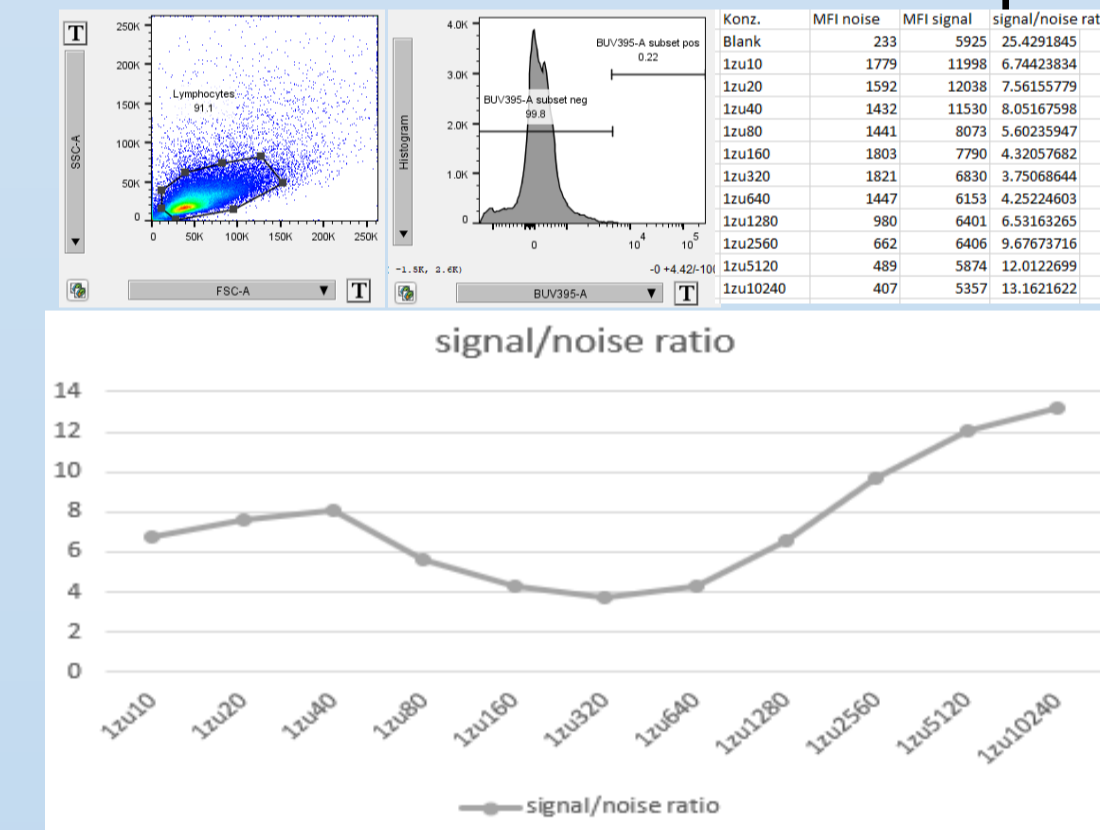


Abb. 7: Zusammenstellung der Titration von CD4 mit frischer Zellsuspension

6. Diskussion

Die Resultate der Titrations zeigen einen grossen Unterschied in den beiden Methoden. Bei den Resultaten mit den aufgetauten Zellsuspensionen ist kaum eine klare Population ersichtlich. Somit ist es schwer zu beurteilen, welche Signale nun von den gesuchten Zellen stammen und welche von zerstörten Zellen und anderweitigen störenden Faktoren stammt. Deshalb kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob diese Resultate so verwendet werden könnten. Hingegen bei den Resultaten mit den frischen Zellsuspensionen ist eine klare Population ersichtlich und somit eine bessere Beurteilung möglich, ob es sich tatsächlich um die gesuchten Zellen handelt. Daher sind diese Resultate eher verwendbar und man hat mit grösster Wahrscheinlichkeit genauere Ergebnisse bei der Titration. Um aber hier feststellen zu können, ob es sich um signifikante Resultate handelt, muss die Titration öfters als nur einmal durchgeführt werden. Auch, damit man die Resultate statistisch auswerten kann und sieht, ob es sich nicht nur um ein zufälliges Resultat handelt. Für die Wiederholungen der Experimente empfehle ich die Titrations jeweils mit frischen Zellsuspensionen durchzuführen, weil es klarer abgrenzbare Populationen in den Ergebnissen generiert.

Zielsetzung:

Es konnte mit Hilfe der GPS ein Panel fertig erstellt werden und das Vorgehen dazu kann den Nutzern zur Verfügung gestellt werden. Die zu detektierenden Marker sind den passenden Fluorochromen zugeteilt worden. Dabei wurde darauf geachtet, dass Marker, welche auf der Zielzelle stark exprimiert werden, den weniger hellen Fluorochromen zugeteilt werden und umgekehrt die Marker, welche nur schwach exprimiert werden, den hellen Fluorochromen zugeteilt werden. Die Antikörpertitration, zur Bestimmung des Verdünnungsverhältnisses der Antikörper, konnte jeweils mit aufgetauten und mit frischen Zellsuspensionen durchgeführt werden. Die frischen Zellsuspensionen lieferten dabei die besseren Resultate. Um diese Resultate zu bestätigen müssten die Titrations noch mehrmals durchgeführt werden, damit sie statistisch ausgewertet werden können. Jedoch konnte nicht überprüft werden ob dieses Panel auch wirklich funktioniert. Dafür fehlt die RIM, mit welcher man sieht, ob sich die gewählten Fluorochrome untereinander zu stark stören. Zudem fehlt ein praktisches Experiment zur Testung des Panels zur Bestätigung, ob es die gewünschte Prozentzahl an Treg (1-4%) detektiert oder nicht. Diese Experimente müsste man ebenfalls noch mehrmals durchführen, um sie statistisch auswerten zu können.